

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/EP 03/05763

10/519174



REC'D 29 JUL 2003
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 30 893.4
Anmeldetag: 09. Juli 2002
Anmelder/Inhaber: Dr. Fischer AG,
Triesenberg/LI
Bezeichnung: Verfahren zur Eigenschaftsbestimmung und/oder
Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen
und/oder peripheren blutmononuklearen Zellen
sowie Analyseanordnung zur Durchführung des
Verfahrens
Priorität: 26.06.2002 DE 102 28 548.9
IPC: G 01 N 33/53

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 26. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

 Hoß

Best Available Copy

Meissner, Bolte & Partner

Anwaltssozietät GbR
Postfach 860624
81633 München

Professor Dr. Fischer AG
Lavadina 1456
FL-9497 Triesenberg

9. Juli 2002
M/FIA-020-DE/I
MB/KR/kh

Verfahren zur Eigenschaftsbestimmung und/oder Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen und/oder peripheren blutmononuklearen Zellen sowie Analyseanordnung zur Durchführung des Verfahrens

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Eigenschaftsbestimmung und/oder Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen und/oder peripheren blutmononuklearen Zellen (PBMC) sowie eine Analyseanordnung zur Durchführung eines solchen Verfahrens.

5

Aus Sinha, Wilson, Gleason: Immunoelectron microscopic localization of prostatic-specific antigen in human prostate by the protein A-gold complex, Cancer, 1987, 60, 1288-91, ist es bekannt, elektronenmikroskopische Untersuchungen von Zellen aus Prostatageweben vorzunehmen, wobei nach 10 der erwähnten Literaturstelle normale Gewebe aus der Prostata, Prostata-Karzinomgewebe und Prostata-Hyperplasiegewebe mit Gold-gelabelten PSA-Antikörpern inkubiert wurden. Die Untersuchungen ergaben, daß sich die Goldpartikel im Cytoplasma, in intrazellulären Granula, dem RES und Lysosomen befinden. Mit zunehmender Entdifferenzierung eines Tumors 15 erscheinen mehr Gold-Partikel in Membranstrukturen. Dies wurde als ein Zeichen dafür bewertet, daß PSA (Prostata-spezifisches-Antigen) mit zunehmender Entdifferenzierung der Tumorzellen in Membranstrukturen eingelagert wird. Ein weiterer Aspekt der dortigen Untersuchung war, daß Gold-Partikel ebenfalls in Granulozyten und Macrophagen erkannt wurden.

20

Bei durchflußzytometrischen Untersuchungen wurden Zellen im zirkulierenden Blut gefunden, die PSA-positiv waren. Bei den vorbekannten Untersuchungen wurden aber nur die Oberflächen der Macrophagen gefärbt.

Die Tatsache, daß keine mRNA des PSA-Moleküls in den Macrophagen gefunden wurde, läßt nur den Schluß zu, daß nur das PSA-Molekül aufgenommen wird und es sich nicht um die Elimination von Micrometastasen handelt. Verwiesen sei hier auf Brandt, Griwatz, Brinkmann: Circulating prostate-specific antigen/CD14-double-positive cells; a biomarker indicating low risk for hematogeneous metastasis of prostate cancer, J.Natl. Cancer Inst. 1997; 89, 174.

- 10 Bekanntermaßen werden bösartige Veränderungen von gewebständigen Zellen, die in einem mehr oder weniger geordneten Zellhaufen zusammenliegen, als Tumor bezeichnet. Diese Tumorzellen mißachten die Ordnung der Gewebe, wachsen ungehemmt und expandieren durch Größenzunahme sowie durch Infiltration in das andere umliegende Gewebe, Organ, oder wachsen 15 über die Organgrenzen hinaus in die Blutbahn und das Lymphsystem. Erreicht ein Tumor die Blutbahn oder das Lymphsystem, so können hier die Einzelzellen oder Zellhaufen über diese Systeme abschwimmen und sich als Tochtergeschwülste, d.h. Metastasen an anderen Orten des Körpers festsetzen. Hier besteht die Gefahr, daß die Metastasen weiter wachsen und dem 20 Körper Energie rauben, bis dieser schließlich verfällt und seiner Erkrankung erliegt.

Bei der Entwicklung eines solchen Tumors werden von den Tumorzellen Substanzen produziert, die dazu dienen, dieses Wachstum zu unterstützen. Zusätzlich können Stoffe freigesetzt werden, die als Indikator für Tumorwachstum Verwendung finden. Letztere werden als Tumormarker bezeichnet. Diese Marker sind aber nicht spezifisch für einen Tumor, sondern nur die Höhe der gemessenen Konzentration im Blut, da auch gesunde Zellen 25 derartige Stoffe freisetzen können. Tumormarker können daher nicht der Auffindung eines Tumors, sondern nur zur Kontrolle des Krankheits- oder Therapieverlaufs herangezogen werden. Ein spezifischer Marker für einen Tumor ist das Prostata-spezifische-Antigen (PSA), welches ab einer gewissen Konzentration im Blut auf ein Prostatakarzinom hinweist. Eine gutartige Vergrößerung der Prostata kann allerdings auch eine Erhöhung des PSA-Werts im Blut hervorrufen.

Bisher werden Tumorerkrankungen vorwiegend über bildgebende Verfahren, wie Ultraschall oder Computertomographie, Mammographie oder dergleichen diagnostiziert. Eine endgültige Entscheidung erfolgt allerdings erst nach einer tumorhaltigen Gewebeprobe mit Festlegung des Therapieverlaufs.

5

Das dem menschlichen Körper eigene Immunsystem wirkt Tumorerkrankungen entgegen. Dieses Immunsystem besteht aus einer Reihe von verschiedenen Zelltypen, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Unter anderem haben die Macrophagen die Aufgabe, bestimmtes krankhaftes Material zu erkennen und es zu phagozytieren und in seine Bestandteile zu zerlegen. Anschließend werden Fragmente der gefressenen Zellen an der Oberfläche anderen Immunzellen präsentiert, damit diese die Möglichkeit haben, die Struktur zu erkennen, gegen die vorgegangen werden soll.

10

15 Es besteht ein dringendes Bedürfnis, bereits in einem frühzeitigen Stadium eine Eigenschaftsbestimmung von zirkulierenden Macrophagen vorzunehmen, ohne daß unmittelbar Untersuchungen am menschlichen Körper vorgenommen werden müssen.

20

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Verfahren sowie eine Analyseanordnung anzugeben, mit deren Hilfe eine Eigenschaftsbestimmung und/oder Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen (PBMC) möglich wird.

25

Erfindungsgemäß wird davon ausgegangen, daß Antigene oder Fragmente von phagozytierten Tumorzellen in zirkulierenden Macrophagen nachweisbar sind, so daß damit ein direkter und spezifischer Tumornachweis geführt werden kann.

30

Erfindungsgemäß wird eine Entnahme von Vollblut mit anschließender Gradientenzentrifugation zur Isolierung von Macrophagen vorgenommen. Die Macrophagenzellen werden dann perforiert und es wird eine intrazelluläre Färbung der Zellen mit mindestens einem ausgewählten Antikörper realisiert.

35

Im Anschluß wird auf die an sich bekannte Durchflußzytometrie zurückgegriffen, um die Zelleigenschaften auf Einzelebene zu dokumentieren.

Die Durchflußzytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Konkret wird mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben, 5 z.B. Antikörpern, eine Bestimmung der Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelebene vorgenommen und dokumentiert.

Grundlage ist hier die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die 10 Zellen einer Einzelsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei entsprechender Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie 15 in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern je Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur, d.h. Granularität des Zytoplasmas, die 20 Größe des Zellkerns und so weiter gewonnen.

Als ausgewählte Antikörper kommen Prostata-spezifische Antigene, Cytokeratin-Antikörper und/oder epitheliales Membranantigen zur Anwendung.

Über die Färbung des PSA-Antikörpers in den Macrophagen ist dann erfahrungsgemäß bestimmbar, ob das phagozytierte Material prostatarelevant ist.

Die Analyseanordnung zur Durchführung des Verfahrens umfaßt Mittel zur 30 Heparinisierung von entnommenem Blut, einen Gradientenzentrifugator zur Isolation von Macrophagen, Mittel zur Zellperforation, eine Einrichtung zur intrazellulären Färbung mit fluorochromierten Antikörpern der vorbehandelten Zellen und ein Durchflußzytometer mit rechnergestützter Auswerte-einheit zum Feststellen der intrazellulären Struktur der jeweils isolierten und 35 vorbehandelten Zelle zum Zwecke der Tumorfrüherkennung.

Die Erfindung soll nachstehend anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert werden.

- 5 Im Schritt der Blutentnahme und Färbung wird von beispielsweise 6 ml Vollblut ausgegangen, das einer Heparinisierung unterzogen wird. Mit Hilfe der Gradientenzentrifugation erfolgt eine Isolierung von Monozyten, Macrophagen und Lymphozyten.
- 10 In einem nächsten Schritt wird eine Formaldehydfixierung und Saponin-behandlung der Zellen zum Zwecke der Perforation durchgeführt.

Folgend schließt sich der Schritt der intrazellulären Färbung mit ausgewählten Antikörpern z.B. der nachstehenden Tabelle an.

- 15
- PSA-Antikörper Ab-1 (Clone ER-PRS)
Pan-Cytokeratin-FITC
Epithelial Membrane Antigen (Clone E 29)
Isotypenkontrolle IgG1 (Clone DAK-GO1)
- 20 Sekundärantikörper FITC Ziege-Anti-Maus (DAKO)

Die entsprechend bis zur Analyse erneut fixierte Zelle wird dann mittels

Durchflußzytometrie näher untersucht. Monozyten und Macrophagen werden gegated, d.h. es wird nur ein Teil der Meßergebnisse zur Auswertung herangezogen und eine Vorauswahl getroffen.

Über eine Histogrammauswertung wird dann die Isotypenkontrolle und Färbung beurteilt und es erfolgt eine Angabe der positiven Zellen, z.B. in Prozent.

- 30 Es hat sich gezeigt, daß bei der Färbung der Macrophagen mit Cytokeratin bei Patienten mit verstreutem Prostatatumor Anteile der Baustuktur von Gewebezellen in den zirkulierenden Immunzellen der entsprechenden Person zu finden sind. Da diese Bauelemente nicht ursprüngliche Inhalte der Immunzellen darstellen, müssen diese durch Phagozytose aufgenommen
- 35

worden sein. Ein unspezifischer Effekt kann ausgeschlossen werden, da der aufgenommene Kurvenverlauf des Cytokeratins sich deutlich von dem des Isotyps unterscheidet.

- 5 Die Färbung des PSA in Macrophagen beweist, daß es sich bei dem phagozytierten Material um Prostatagewebe handeln muß, da auch dieser spezifische Marker nachweisbar ist.

Insgesamt ist mit dem beschriebenen Verfahren und der zugehörigen Analyseanordnung eine neuartige Methode zur Eigenschaftsbestimmung und Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen gegeben, wobei die Klassifikation Aussagen über mögliche prostatarelevante Inhalte zuläßt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren sowie eine Analyseanordnung zur Eigenschaftsbestimmung und/oder Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen und/oder peripheren blutmononuklearen Zellen. Das entnommene Vollblut wird einer Gradientenzentrifugation zur Isolierung von Macrophagen unterzogen. Die Macrophagenzellen werden dann perforiert und mit einer intrazellulären Färbung mit mindestens einem ausgewählten Antikörper versehen. Eine durchflußzytometrische Analyse der vorbehandelten Zellen ermöglicht dann eine anschließende statistische Bewertung der Zellinhalte. Als Antikörper wird PSA, Cytokeratin und/oder epitheliales Membranantigen ausgewählt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Eigenschaftsbetimmung und/oder Klassifikation von zirkulierenden Macrophagen und/oder peripheren blutmononuclearen Zellen mit folgenden Schritten:
 - Entnahme von Vollblut sowie Gradientenzentrifugation zur Isolierung von Macrophagen,
 - Perforation der Macrophagenzellen,
 - intrazelluläre Färbung der Zellen mit mindestens einem ausgewählten Antikörper sowie
 - durchflußzytometrische Analyse der vorbehandelten Zellen mit anschließender statistischer Bewertung über mehrere Zellen.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
gekennzeichnet durch
die Verwendung von Prostata-spezifischen Antigen (PSA), Cytokeratin und/oder epitheliales Membranantigen als dem oder den auszuwählenden Antikörpern.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
gekennzeichnet durch
Histogrammauswertung der Isotypenkontrolle und Färbung nach durchgeföhrter Durchflußzytometrie.
4. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche zum Erkennen von durch Phagozytose aufgenommenen Anteilen von Gewebezellen eines verstreuten Prostatatumors außerhalb des menschlichen Körpers.
5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet, daß
über die Färbung des PSA in den Macrophagen bestimmt wird, ob das phagozytierte Material prostatarelevant ist.

Best Available Copy

6. Analyseanordnung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorangegangenen Ansprüche,
umfassend

Mittel zur Heparinisierung von entnommenem Blut, einen Gradientenzentrifugator zur Isolation von Macrophagen, Mittel zur Zellperforation, eine Einrichtung zur intrazellulären Färbung der vorbehandelten Zellen mit fluorochromierten Antikörpern und ein Durchflußzytometer mit rechnergestützter Auswerteeinheit zum Feststellen der intrazellulären Struktur der jeweils isolierten und vorbehandelten Zelle zum Zweck der Tumorfrüherkennung.

Rest Available Copy